

생쥐의 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)- 유도 신경독성에 대한 대황의 보호효과

이형철 · 김대근 · 조원준 · 황석연* · 이영구** · 김명동*** · 전병훈#

원광대학교 한의과대학 병리학교실, *충북대학교병원 임상병리과, **KT&G중앙연구원 생화학실

***상지대학교 한의과대학 생리학교실

(Received August 16, 2002; Revised November 28, 2002)

Protective Effect of *R. palmatum* on 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced Neurotoxicity in Mice

Hyung Chul Lee, Dae Geun Kim, Won jun jo, Seok Yeon Hwang*, Young Gu Lee**
Myung Dong Kim*** and Byung Hun Jeon#

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749

*Department of Clinical Pathology, Chungbuk National University Hospital, Cheongju 361-711

**Laboratory of Biochemistry, KT&G Central Research Institute, Taejon 305-345

***Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Songji University, Wonju, 220-702, Korea

Abstract — The protective efficacy of *Rheum palmatum* water extract on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced parkinsonism was studied in C57BL/6 mice. In order to demonstrate neuroprotective effect of *R. palmatum* extract, animals were administered intraperitoneally with the water extract (100 or 200 mg/kg/day) for 14 days, and MPTP (10 mg/kg/day) was injected subcutaneously into the mice for the first 6 consecutive days from the beginning 1 hr before *R. palmatum* extract treatment. All animals were measured the several neurobiochemical markers such as dopamine level and monoamine oxidase B (MAO-B) activity in various regions of brain. The treatment of mice with *R. palmatum* extract was confirmed recovery effect on MAO-B activity in the cerebellum and the cerebral cortex. *R. palmatum* extract was attenuated the MPTP-induced depletion of substantia nigra dopamine. The contents of MDA, a marker of lipid peroxidation, in brain tissues (cerebellum and cerebral cortex mitochondria) were decreased significantly by *R. palmatum* extract. These results suggest that *R. palmatum* water extract plays an effective role in attenuating MPTP-induced neurotoxicity in mice. This protective effect of *R. palmatum* might be estimated the result from the inhibitory activity on monoamine oxidase B and the enhancement of antioxidant activity.

Keywords □ *Rheum palmatum*, 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP), monoamine oxidase B (MAO-B), dopamine, lipid peroxidation, C57BL/6 mice

Meperidine(1-methyl-4-phenyl-4-propionoxypiperidine)의 유사물질인 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)는 항정신성 의약품인 meperidine의 합성과정중 생성되는 부산물^{1,2)}로서 parkinsonism을 유도하는 신경독성물질로 잘 알려져 있다. Chiba 등³⁾ 및 Markey 등⁴⁾은 MPTP가 brain barrier를 통과하면서 monoamine oxidase B(MAO-B)에 의하여 2개의 전자가 산화되어 1-methyl-4-phenyl-2,3-dihydropyridinium(MPDP)로 대사되고, 다시 2개의 전자가 산화되어 1-methyl-4-phenyl-

pyridinium(MPP⁺)으로 대사된다. MPP⁺는 뇌의 nigro-stratal system에 축적되어 dopamine 생성 신경세포에 강력한 산화적 손상으로 신경독성이 유발된다.⁵⁾ 또한 이러한 대사산물은 칼슘 이온의 항상성 변화 및 지질과산화물을 유도하며,⁵⁻⁷⁾ 미토콘드리아의 NADH ubiquinone oxidoreductase의 활성을 억제하여 세포를 손상시킨다.^{8,9)} 이와 같은 요인으로 MPP⁺는 dopamine의 생성세포를 파괴하거나 생성기전을 변화시켜 선조체의 dopamine 함량이 감소됨으로써 퇴행성 신경질환이 유발된다.^{10,11)} 따라서 신경독성물질인 MPTP는 dopamine의 손실을 가져오며 파킨슨씨병과 유사한 증상을 나타내므로 파킨슨 질환의 질환동물 유도에 많이 사용된다.^{7,10,11)} 또한 MPTP의 생체내 대사는 MAO의 활성에 가장 큰 영향을 받는 것으로 이미 보고되었으며,^{3,4)} MAO

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 063-850-6843 (팩스) 063-856-6843
(E-mail) omdjbh@wonkwang.ac.kr

의 활성증가는 MPTP의 대사를 촉진함으로써 활성산소의 생성을 증가시켜 신경세포를 손상시킨다.¹²⁾ MAO는 아미노산 서열 및 기질 특이성에 따라 두 종류로 구분되는데, MAO-A는 noradrenaline 및 5-hydroxytyramine을 대사하고 clorgyline 및 harmine 등에 의한 저해되며, MAO-B는 dopamine을 대사하는 효소로서 L-deprenyl과 같은 약물에 의하여 저해된다.¹³⁻¹⁶⁾ 따라서 MAO-B 억제제는 MPTP의 독성에 의하여 유발되는 신경의 퇴행과정을 길항하는 작용을 하며 MPTP의 대사를 억제하여 신경독성을 감소시키므로,^{15,16)} 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.^{7,15,17-19)} 이상에서와 같이 파킨슨씨병은 뇌의 흑질에 존재하는 신경세포의 파괴로 선조체의 dopamine 함량이 감소되어 일어나는 퇴행성 신경질환으로서 sporadic Parkinson's disease의 경우 MPTP와 같은 신경독성물질이 큰 요인 중의 하나로 지목되고 있다.^{15,20-22)} 이 경우 뇌조직의 monoamine oxidase는 두 가지 생물학적 의미를 갖는다. 첫째는 이 효소의 활성이 증가되면 신경독성 대사물질의 생성이 증가되는 반면 dopamine의 함량이 감소되는 것이고, 둘째는 신경독소인 MPP⁺ 그 자체가 활성산소를 생성시키는 요인이 되지만 dopamine과 같은 카테콜라민이 대사될 때 H₂O₂와 같은 활성산소가 생성되어 세포의 산화적 손상이 증가되는 것이다.²³⁻²⁵⁾ 따라서 MAO-A 또는 MAO-B의 활성 억제는 체내의 MPTP에 의한 신경독성을 억제하는 동시에 활성산소의 생성을 억제하며, 나아가서 dopamine이 분해되는 것을 억제한다.

대황(*Rheum palmatum*)은 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 건조된 뿌리를 민간 및 한방에서 약재로 사용된다. 일반적으로 혈소판 감소증, 지혈, 구내염, 모낭염 및 화상 등을 치료하는데 사용되며, 항균작용 및 항종양작용 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으나¹²⁾ 사하작용 등의 독성 때문에 사용상에 주의할 요하고 있다. 노화 및 퇴행성 뇌질환은 유해 활성산소에 의해 유발되며^{27,28)} MAO-B 활성도의 증가는 물질대사 과정에서 활성산소를 생성하기 때문에 알츠하이머씨병이나 파킨슨씨병과 같은 퇴행성 신경질환이 촉진된다.²⁹⁾ 본 연구자들은 선행 연구에서 38종의 한약재중 대황 물 추출물이 *in vitro* 상에서 항산화 효과 및 MAO-B 억제활성이 탁월하다는 것을 입증한 바 있다.³⁰⁾

본 연구에서는 대황이 MPTP로 유도된 신경독성의 완화 효과를 연구함으로써 뇌질환의 개선 및 치료 가능성이 있는지 조사하였다.

실험방법

대황의 물 추출물 제조

본 실험에 사용한 대황은 서울 경동시장에서 중국산을 구입하여 감별한 후 사용하였으며, 현재 표준시료는 원광대학교 한의

과대학 병리학교실에 보관되어 있다. 건조 대황 400 g을 분쇄한 후 플라스크에 넣고 증류수 4,000 ml로 3시간 동안 가온 추출하였다. 추출물은 여과한 후 회전농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 시료는 -70°C에서 결빙시킨 후 동결건조기를 사용하여 건조된 분말을 얻었고 냉동보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물

실험동물은 생후 3개월된 체중 22~25 g인 웅성 생쥐(C57BL/6 mice)를 샘타고로부터 구입하여 사용하였으며, 한 cage에 4마리씩 넣어 사육하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도는 22±2°C, 습도 40~60%, 환기는 1시간당 12~15회로 하였다. 1일 중 12시간은 200~300 Lux로 조명하고 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 사료는 삼양사의 제품으로 충분히 공급하였으며, 음수는 정제된 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험군

실험동물은 대조군(CON; saline 단독 투여군), 대황 100 mg 단독 투여군(RL), 대황 200 mg 단독 투여군(RH), MPTP 단독 투여군(MPTP), 대황 100 mg 및 MPTP 병용 투여군(RL-MPTP), 대황 200 mg 및 MPTP 병용 투여군(RH-MPTP)의 6 실험군으로 구분하였으며, 한 실험군에 8마리씩 사용하였다. MPTP는 10 mg/kg의 농도로 6일(1회/1일) 동안 피하로 투여하였다. 대황 물 추출물의 투여용량은 예비실험결과 투여 100 mg/kg에서 MPTP 독성완화 효과가 있는 것으로 판단되어 용량을 100 mg/kg 및 200 mg/kg으로 설정하였으며, 추출물은 14일(1회/1일) 동안 경구 투여하였다. 대황과 MPTP 병용 투여군에서 대황은 MPTP를 투여하기 1시간 전에 6일 동안 병용 투여한 다음, 7일째부터는 8일 동안 대황(RL 및 RH)을 단독으로 투여하여 대황 물 추출물의 총 투여기간은 14일이었다. 실험동물은 대황 물 추출물을 마지막으로 투여하고 24시간 절식시킨 다음, CO₂로 마취하여 뇌를 적출하였다.

뇌의 부위별 적출

생쥐로부터 적출한 뇌는 혈액 및 이물질을 제거한 다음 250 mM sucrose가 포함된 0.9% NaCl로 세척하였다. 뇌의 부위별 적출은 면봉을 이용하여 대뇌피질, 흑질, 소뇌 및 선조체로 구분하여 적출하였고 모든 과정은 얼음 위에서 수행하였다.

뇌 조직의 분획조제

생쥐로부터 적출한 뇌는 전뇌(whole brain), 대뇌피질, 소뇌, 흑질 및 선조체로 구분하였고 부위별로 각각 균질액 및 미토콘드리아 분획을 제조하였다. 즉, 각 부위별로 적출한 뇌는 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 균질화한 다음 원심분리(1,000 g, 10분)하여 상등액을 균질액으로 사용하였다. 또한 상등

액은 다시 고속원심분리(12,000 g, 15분)하여 얻은 pellet을 동일 buffer로 2회 씻어낸 다음 균질화하여 미토콘드리아 분획으로 사용하였다. 모든 단계는 4°C에서 수행하였고 제조한 분획은 -70°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

단백질 정량

모든 시료의 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준단백질로 사용하여 Lowry 등³¹⁾의 방법에 따라 측정하였다.

지질과산화 측정

MDA의 함량은 지질과산화의 지표로서 Suematsu 등³²⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 즉 25 mM Tris-HCl buffer(pH 7.4), 1.0% acetic acid, 0.6% SDS, 0.38% thiobarbituric acid 혼합액에 뇌 균질액 또는 미토콘드리아 분획을 첨가한 다음 98°C의 항온수조에서 30분간 끓인 다음 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

MAO-B의 활성도 측정

MAO-B의 활성도는 Kalaria 등³³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4) 및 30 mM sodium azide와 기질로 10 mM benzylamine을 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1.8 mM 2,2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonic acid)와 5 unit peroxidase를 넣어 15초간 반응시킨 후 5% sodium dodecyl sulfate가 포함된 0.75 M hydrochloric acid를 첨가하여 반응을 종결시킨 다음 414 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Dopamine의 함량측정

Dopamine의 함량은 Zou 등²²⁾의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 신경 독성물질인 MPTP는 특징적으로 선조체의 dopamine 함량감소가 초래되므로 dopamine 생성 신경세포인 흑질과 선조체에서 dopamine 함량을 측정하였다. 생쥐로부터 적출한 선조체 및 흑질은 0.1 mM EDTA가 포함된 0.1 M perchloric acid로 균질화(W/V, 1:20)한 다음 원심분리(12,000 rpm, 15 min)하였다. 그 상등액을 취하여 mobile phase로 희석한 다음, HPLC를 이용하여 측정하였다. Mobile phase에서는 0.1 M acetic acid-citric acid(pH 3.5) 83%, MeOH 17%, 0.1 mM EDTA 및 0.5 mM sodium octane sulfonic acid가 함유되어 있다. Mobile phase는 0.2 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다. 분석 column은 Capcell Pak C18(4.6 mm id×150 mm)를 사용하였으며, 유속은 0.5 ml/min으로 분석하였다.

통계처리

대조군과 실험군의 생리활성은 평균 및 표준편차로 나타내었

으며, 대조군 및 MPTP 단독 투여군과의 통계학적인 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 P값이 0.05 보다 작은 값을 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)의 독성 및 작용기전실험은 다양한 실험동물을 모델로 연구되어 왔다. Muthane 등³⁴⁾이 C57BL/6 mouse가 다른 실험동물보다 MPTP에 의한 신경독성이 잘 유발된다고 보고함으로써 많은 연구자들은 파킨슨씨병의 발병기전 및 치료제 개발 등을 연구하는데 실험동물의 모델로서 C57BL/6 mouse를 주로 사용하고 있다. 실험동물모델에서 MPTP의 신경독성을 완화시킨다고 알려진 것은 L-deprenyl,³⁵⁾ sodium salicylate²¹⁾ 및 pramipexole²²⁾ 등이 보고되었다. 천연물 수준에서는 *Ginkgo biloba* 추출물(EGb 761)이 신경독성 완화효과가 있는 것으로 보고되었다.³⁶⁾ 효소반응 및 이 물질대사 등의 과정 중에 형성된 활성산소는 지질과산화, 세포 손상 및 독작용을 유발하며,³⁶⁾ 활성산소에 의한 산화적 손상은 암뿐만 아니라 파킨슨씨병 및 알츠하이머씨병 등과 같은 퇴행성 뇌 질환의 주요 발병원인과 연관성이 높다.^{28,36,37)} 본 연구자들은 선행연구에서 38종의 한약재 물 추출물로부터 항산화 효과 및 monoamine oxidase B(MAO-B) 활성 억제효과를 *in vitro* 조건 하에서 조사한 결과,³⁰⁾ 생리활성이 탁월한 대황을 선정하여 대황이 MPTP 신경독성물질의 대사에 미치는 영향을 검토하기 위한 기초연구로서 본 연구를 수행하였다.

MPTP와 같은 신경독성물질을 투여함에 따라 활성산소가 생성되므로 MDA의 함량이 증가하는 것으로 알려져 있으며,^{22,24)} MPTP 투여에 의한 생체내에서의 MDA 함량 증가는 L-deprenyl¹⁶⁾ 및 pramipexole²²⁾을 처리하면 감소된다. 본 연구에

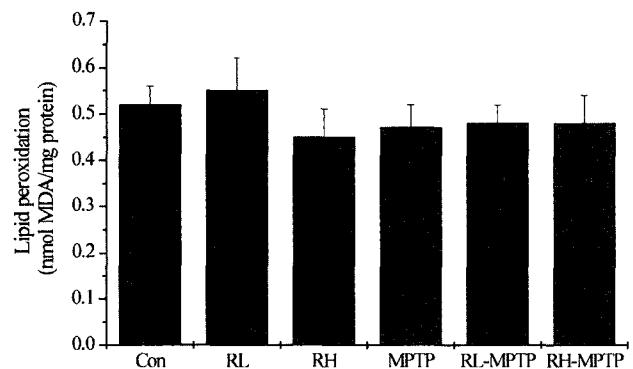


Fig. 1 - Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on lipid peroxidation in the whole brain mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. CON, treatment of saline alone; RL, low dose treatment of *R. palmatum* extract (100 mg/kg); RH, high

서 MDA 함량은 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아에서 각각 측정하였다. 전뇌 미토콘드리아 분획의 MDA 함량은 대조군(CON 실험군)이 0.52 nmol/mg protein이었고 MPTP 단독 투여군(MPTP 실험군)은 0.45 nmol/mg protein으로 대조군과 유의한 차이가 관찰되지 않았다. 또한 대황 단독 투여군들(RL 및 RH 실험군) 및 대황과 MPTP의 병용 투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서도 대조군 및 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 1). 반면 대뇌피질의 미토콘드리아 분획에서 대조군의 MDA 함량은 0.64 nmol/mg protein이었고 MPTP 실험군에서는 0.75 nmol/mg protein으로 CON 실험군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황 단독 투여군인 RL 및 RH 실험군의 MDA 함량은 0.63 및 0.60 nmol/mg

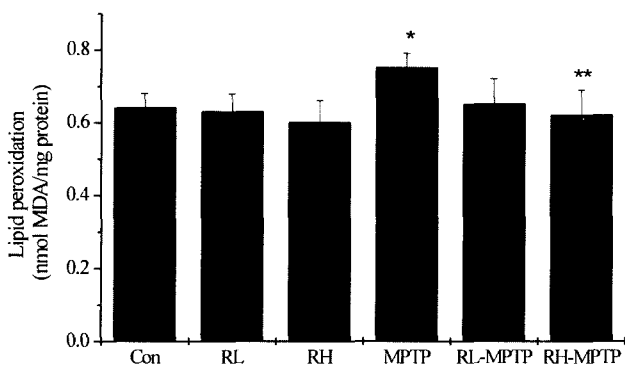


Fig. 2 – Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on lipid peroxidation in the cerebral cortex mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at $P < 0.05$, respectively. Notes on group designation are the same as in Fig. 1.

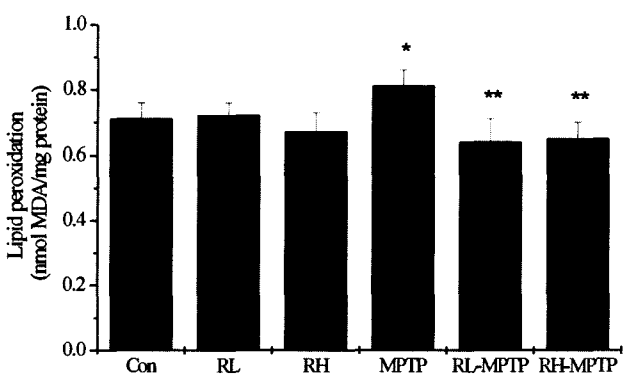


Fig. 3 – Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on lipid peroxidation in the cerebellum mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at $P < 0.05$, respectively. Notes on group designation are the same as in Fig. 1.

protein으로 대조군에 비해 유의한 증가가 관찰되지 않았고, RL-MPTP 실험군은 0.65 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 감소되는 양상을 보였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 반면 고농도의 대황 및 MPTP를 병용 투여한 RH-MPTP 실험군은 0.62 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소 양상을 나타내어 CON 실험군과 유사한 수준으로 회복되었다(Fig. 2). 소뇌의 미토콘드리아에서 지질과산화를 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 미토콘드리아 분획의 MDA 함량은 CON 실험군이 0.71 nmol/mg protein이었고 MPTP 실험군에서는 0.81 nmol/mg protein으로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황 단독 투여군인 RL 및 RH 실험군의 MDA 함량은 0.72 및 0.67 nmol/mg protein으로 CON 실험군에 비하여 유의한 증가가 관찰되지 않았다. 반면 RL-MPTP 실험군에서는 0.64 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소가 확인되었으며, RH-MPTP 실험군에서도 0.65 nmol/mg protein으로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내어 대황 및 MPTP 병용 투여군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군) 모두에서 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다(Fig. 3). 따라서 MPTP의 투여는 뇌영역에 따라 지질과산화 정도 차이가 있음을 알 수 있었다. 전뇌에서는 대황 및 MPTP에 의한 영향은 관찰되지 않았고 대뇌피질 및 소뇌에서는 MPTP에 의해 증가된 지질과산화 정도가 대황 추출물의 투여로 완화시켜주는 것이 관찰되었다. 이는 대황 추출물이 항산화 효과가 탁월하므로³⁰⁾ 뇌조직에서의 활성산소와 같은 자유 라디칼의 생성을 억제하고 이로 인해 MPTP에 의한 신경세포의 손상을 방지하게 되는 것으로 생각된다.

Dopamine의 함량은 MPTP의 신경독성에 대한 보호효과를 조사하는 지표로서 많은 연구에서 측정되었다. 선조체에서 dopamine 함량 감소는 뇌의 MAO-B 활성도가 증가되어 MPTP의 대사가 촉진됨으로써 nigro-striale MPP⁺가 축적되어 일어난다. MPP⁺의 축적은 파킨슨씨병과 같은 퇴행성 신경질환을 유발하는 직접적인 원인이 된다. 그러므로 MAO-B inhibitor는 파킨슨 질환³⁹⁾나 우울증⁴⁰⁾을 치료하는데 이미 활용되고 있다. 본 연구에서는 MAO-B 활성 억제 및 항산화 효과가 탁월한 대황 추출물을 투여한 후 monoamine oxidase B(MAO-B)의 활성을 전뇌, 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아 분획에서 각각 측정하였다. 대황(RL 및 RH 실험군)이나 MPTP 단독 투여군(MPTP 실험군), 또는 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험동물(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서 전뇌 미토콘드리아 분획의 MAO-B 활성도를 측정 한 결과는 Fig. 4와 같다. MPTP 단독 투여군은 대조군에 비해 MAO-B 활성도가 약간 증가하였으나 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 또한 대황 및 MPTP를 병용 투여한 실험군들에서도 전뇌의 MAO-B 활성도의 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 4). 대뇌피질 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정 한 결과,

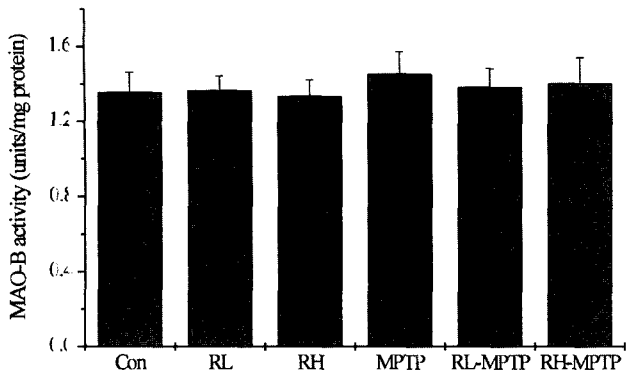


Fig. 4 - Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the whole brain mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. Notes on group designation are the same as in Fig. 1.

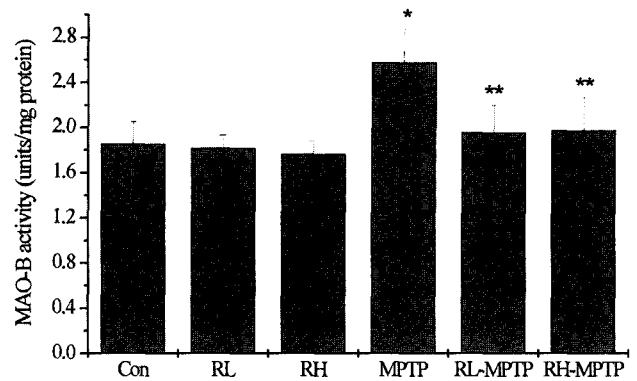


Fig. 6 - Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the cerebellum mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at $P < 0.05$, respectively. Notes on group designation are the same as in Fig. 1.

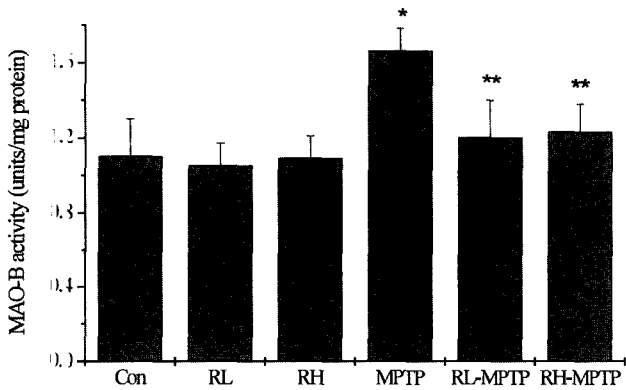


Fig. 5 - Effect of *R. palmatum* and MPTP treatment on monoamine oxidase B activity in the cerebral cortex mitochondria of mice. Animals were sacrificed 24 hr after the last *R. palmatum* water extract treatment. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. *, **Significantly different from the control group and MPTP group at $P < 0.05$, respectively. Notes on group designation are the same as in Fig. 1.

대황 단독 투여군들(RL 및 RH 실험군)에서는 대조군과 유사한 수준을 나타내었으나 MPTP 실험군에서는 1.66 units로 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서는 각각 1.20 및 1.23 units로 MPTP 단독 투여군에 비해 유의한 감소를 나타내었으며, 대조군과 유사한 수준으로 회복됨을 보여주었다(Fig. 5). 소뇌 미토콘드리아 분획에서 MAO-B 활성도를 측정 한 결과, 대황 단독 투여군들(RL 및 RH 실험군)에서는 대조군에 비해 다소 낮은 활성을 나타내었으나 유의한 차이는 관찰되지 않은 반면 MPTP 단독 투여한 경우에는 대조군에 비해 유의한 증가양상을 나타내었다. 대황과 MPTP를 병용 투여한 실험군들(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)에서는 각각 1.95 및 1.97 units로

MPTP 실험군에 비해 유의하게 감소되어 CON 실험군과 유사한 수준을 나타내었다(Fig. 6). 생체내에서 MAO-B의 활성증가는 MPTP의 대사를 촉진하여 nigro-striatal system에 신경독성을 지닌 MPP⁺가 축적된다. MAO-B의 억제제는 MPTP의 신경독성을 억제시키는 방법으로 이용된다. 본 연구에서 대황은 MAO-B의 활성을 억제시키는 효과가 있으므로 신경 독성물질로부터 신경 세포를 보호할 것으로 사료된다. MPTP 처리로 신경독성을 유도시킨 실험동물의 선조체 dopamine 함량은 대조군에 비해 30~50% 수준으로 감소되나 EGb 761, L-deprenyl, pramipexole, salicylic acid 또는 riluzole 등을 처리하면 dopamine의 함량이 대조군의 70% 이상의 수준으로 유지된다고 이미 보고되었다.^{17,20-22,41} 다른 연구결과와 마찬가지로 본 연구에서도 선조체의 dopamine 함량은 MPTP를 투여함에 따라 대조군의 50% 수준으로 감소되었으나 대황과 MPTP를 병용투여(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)함에 따라 CON 실험군의 57% 및 62% 수준으로 유지되는 것을 확인하였다. 또한 흑질의 dopamine 함량은 MPTP를 투여함에 따라 대조군의 66% 수준으로 감소하였으나 대황과 MPTP를 병용투여(RL-MPTP 및 RH-MPTP 실험군)함에 따라 대조군의 80% 및 75% 수준을 나타내어 대조군 수준과 근사한 수준으로 회복되었다. 흑질 및 선조체의 dopamine 수준회복은 대황 추출물의 항산화 작용 및 MAO-B 활성 억제효과로 인해 MPTP 대사산물에 의한 신경세포의 손상을 억제하기 때문인 것으로 사료된다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 대황은 뇌조직의 MAO-B 활성을 억제함으로써 MPTP 대사산물에 의한 활성산소의 생성을 감소시키는 동시에 항산화 활성에 의한 뇌조직의 지질과산화물을 억제하게 된다. 이로 인해 dopamine 생성 조직인 흑질의 세포손상을 억제하여 흑질 및 선조체의 dopamine 함량이 다소 회복되는

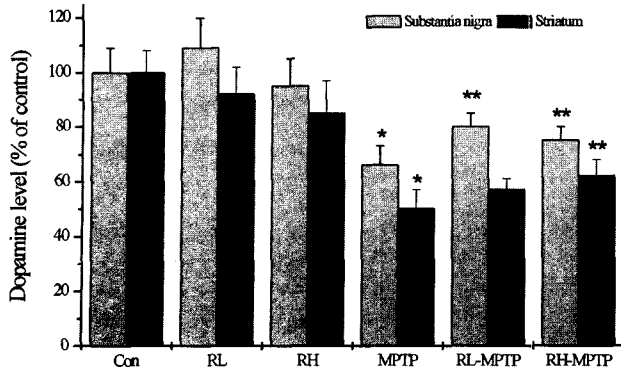


Fig. 7 - Effect of *R. palmatum* water extract treatment against depletion of striatal and substantia nigra dopamine levels by MPTP. Dopamine level striatal and substantia nigra was determined by HPLC and expressed as % of control. Data was expressed as mean \pm SD of 8 animals. Notes on group designation are the same as in Fig. 1. Significantly different from the control group and MPTP group at $P < 0.05$, respectively.

것으로 판단된다. 이러한 결과는 대황이 MPTP 신경독성의 가장 두드러진 특징인 dopamine의 함량 감소를 효과적으로 완화시킬 수 있다는 것을 의미하는 중요한 결과이다. 따라서 파킨슨씨병과 같은 뇌질환을 효과적으로 개선시킬 수 있는 대황의 유효물질 분리 및 복합처방제의 개발은 앞으로 연구해야 할 것으로 판단된다. 대황은 사하작용 등의 독성작용이 있어 주의를 요하는 약물로 알려져 있으나, 본 연구에서는 대황 추출물의 투여군에서 체중의 유의한 변화 및 육안적인 이상증상이 관찰되지 않았다. 이러한 결과 차이는 대황 추출물의 추출방법의 차이로 사하작용과 같은 독성이 없는 것으로 사료된다. 앞으로 대황 추출물의 추출방법에 따른 독성연구도 병행되어야 할 것으로 판단된다.

결론

MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)에 의해 유도된 parkinsonism에 대한 대황의 보호효과와 그 보호작용에 대한 기전을 조사하기 위하여 신경생화학적인 지표성분들을 생쥐(C57BL/6 mouse)에서 측정하였다. 생쥐에서 신경독성에 대한 대황 물 추출물의 보호효과를 조사하기 위하여 대황 물 추출물(100 및 200 mg/kg/day)은 MPTP(10 mg/kg/day)를 피하로 투여하기 1시간 전에 14일 동안 경구 투여하였으며, 처음 6일 동안은 대황과 MPTP를 병용 투여하였다. 실험동물은 대황을 마지막 투여한 후 24시간에 희생시키고 뇌의 부위별로 dopamine 함량 및 monoamine oxidase-B와 같은 신경생화학적인 지표들을 측정하였다. 대뇌피질 및 소뇌의 미토콘드리아 분획에서 MPTP에 의해 증가된 MAO-B 활성이 대황 추출물의 투여로 인해 유의하게 감소되었다. 대황을 처리한 생쥐는 MPTP 투여에 의한

흑질의 dopamine 함량 감소가 효과적으로 억제되었으며, 지질과 산화의 지표인 MDA 함량은 대황 추출물을 처리함에 따라 뇌조직(소뇌 및 대뇌피질 미토콘드리아)에서 유의하게 감소되어 MPTP에 의한 산화적인 손상으로부터 지질과 같은 macromolecule들이 보호되는 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 대황 물 추출물은 생쥐의 MPTP-유도 신경독성을 효과적으로 감소시키며, 이러한 신경독성에 대한 대황의 보호효과는 대황 추출물의 MAO-B의 활성 억제효과 및 항산화 활성에서 기인된 결과로 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 지정 전북도청 지원의 원광대학교 의약자원연구센터(MRRC) 연구비와 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- Langstone, J. W., Ballard, P. and Irwin, R. A. : Chronic parkinsonism in human due to a product of meperidine analog synthesis. *Science* **219**, 979 (1983).
- Burns, R. S., Markey, S. P., Phillips, J. M. and Chiueh, C. C. : The neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in the monkey and man. *Can. J. Neurol. Sci.* **11**, 166 (1984).
- Chiba, K., Markey, S. P., Burns, R. S., Johannessen, J. N., Jacobowitz, D. M. and Kopin, I. J. : Neurochemical and behavioral effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in rat, guinea pig and monkey. *Psychopharmacol. Bull.* **20**, 548 (1988).
- Markey, S. P., Johannessen, J. N., Chiueh, C. S. and Herkenham, M. A. : Intraneuronal generation of a pyridinium metabolic may cause drug-induced parkinsonism. *Nature* **311**, 464 (1984).
- Adams, J. D., Johannessen, J. H. M., Schuller, J. P., Bacon, S. P. and Markey, S. P. : *The role of oxidative stress in the systematic toxicity of MPTP and MPP⁺*. Academic Press New York, p. 571 (1986).
- Poirier, J., Donaldson, J. and Barbeau, A. : The specific vulnerability of the substantia nigra to MPTP is related to the presence of transition metals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **128**, 25 (1985).
- Thiffault, C., Aumont, N., Quirion, R. and Poirier, J. : Effect of MPTP and L-Deprenyl on antioxidants enzymes and lipid peroxidation level in mouse brain. *J. Neurochem.* **65**, 2725 (1995).
- Ramsay, R. R., Salach, J. I., Dadgar, J. and Singer, T. P. : Inhibition of mitochondrial NADH dehydrogenase by pyridine

- derivatives and its possible relation to experimental and idiopathic Parkinsonism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **135**, 267 (1986).
- 9) Mizuno, Y., Saitoh, T. and Sone, N. : Inhibition of mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase activity by 1-methyl-4-pyrrolidinium ion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **143**, 294 (1987).
- 10) Iradbury, A. J., Costall, B., Domeney, A. M., Jenner, P., Kelly, M. E., Marsden, C. D. and Naylor, R. J. : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine is neurotoxic to the nigro-striatal dopamine pathway. *Nature* **319**, 56 (1986).
- 11) Mitra, M., Mohanakumar, K. P. and Ganguly, D. K. : Resistance of golden hamster to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine: relationship with low levels of regional monoamine oxidase-B. *J. Neurochem.* **62**, 1906 (1994).
- 12) Sablino, S. O., Krueger, M. J., Bachurin, S. O., Solovayev, L. S., Ifange, S. M. N. and Singer, T. P. : Oxidation products arising from the action of monoamine oxidase B on 1-methyl-4-benzyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine, A nonneurotoxic analogue of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *J. Neurochem.* **62**, 2012 (1994).
- 13) Yang, H. Y. T. and Neff, N. H. : The monoamine oxidases of brain: selective inhibition with drugs and the consequences for the metabolism of the biogenic amines. *J. Pharm. Exp. Ther.* **189**, 733 (1974).
- 14) Connelly, C. H. and Murphy, D. L. : Substrate and inhibitor-related characteristics of human platelet monoamine oxidase. *Biochem. Pharmacol.* **26**, 853 (1977).
- 15) Cohen, G., Pasik, P., Cohen, B., Leist, A., Mytilineou, C. and Yahr, M. D. : Pargyline and deprenyl prevent the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in monkeys. *Eur. J. Pharmacol.* **106**, 209 (1984).
- 16) Gerlach, M., Richardson, P. and Youdim, M. B. H. : The molecular pharmacology of L-deprenyl. *Eur. Pharmacol. Mol. Pharmacol. Sect.* **226**, 97 (1992).
- 17) Fothblat, D. S. and Schneier, J. S. : The effects of L-deprenyl treatment, alone and combined with GM1 ganglioside, on striatal dopamine content and substantia nigra pars compacta neurons. *Brain Res.* **779**, 226 (1998).
- 18) Foley, P., Gerlach, M., Youdim, M. B. H. and Rieder, P. : MAO-B inhibitors: multiple roles in the therapy of neurodegenerative disorders? *Parkinsonism Related Disorders* **6**, 25 (2000).
- 19) Ecoireau, A., Dubedat, P., Bordier, F., Imperato, A. and Moussaou, S. : The protective effect of riluzole in the MPTP model of Parkinson's disease in mice is not due to inhibition of MPP⁺ accumulation. *Neuropharmacology* **39**, 1016 (2000).
- 20) Vu, W. R. and Zhu, X. Z. : Involvement of monoamine oxidase inhibition in neuroprotective and neurorestorative effects of *Ginkgo biloba* extract against MPTP-induced nigrostriatal dopaminergic toxicity in C57 mice. *Life Sci.* **65**, 157 (1999).
- 21) Mohankumar, K. P., Muralikrishnan, D. and Thomas, B. : Neuroprotection by sodium salicylate against 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity. *Brain Res.* **864**, 281 (2000).
- 22) Zou, L. L., Xu, J., Jankovic, J., He, Y., Appel, S. H. and Le, W. D. : Pramipexole inhibits lipid peroxidation and reduces injury in the substantia nigra induced by the dopaminergic neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57BL/6 mice. *Neurosci. Letters* **281**, 167 (2000).
- 23) Sriram, K., Pai, K. S., Boyd, M. R. and Ravindranath, V. : Evidence for generation of oxidative stress in brain by MPTP: *in vitro* and *in vivo* studies in mice. *Brain Res.* **749**, 44 (1997).
- 24) Kojima, S., Matsuki, O., Nomura, T., Yamaoka, K., Takahashi, M. and Niki, E. : Elevation of antioxidant potency in the brain of mice by low-dose γ -ray irradiation and its effect on 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP)-induced brain damage. *Free Rad. Biol. Med.* **26**, 388 (1999).
- 25) Wong, S. S., Li, R. H. Y. and Stadlin, A. : Oxidative stress induced by MPTP and MPP⁺: selective vulnerability of cultured astrocytes. *Brain Res.* **836**, 237 (1999).
- 26) Ahn, D. K. and Kim, H. C. : Effects of mixture with various kinds of herbs on the extraction amount of sennoside b in *Rhei Radix*. *J. Herbol.* **11**, 75 (1996).
- 27) Nizamuddin, A. : NADPH-dependent and O₂-dependent lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 58 (1987).
- 28) Zhang, Y., Dawson, V. L. and Dawson, T. M. : Oxidative stress and genetics in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurobiol. Disease* **7**, 240 (2000).
- 29) Jossan, S. S., Gillberg, P. G., Gottfries, C. G., Karlsson, I. and Oreland, L. : Monoamine oxidase B in brains from patients with Alzheimer's disease: A biochemical and autoradiographical study. *Neuro. Sci.* **45**, 1 (1991).
- 30) Lee, H. C., Hwang, S.-G., Kim, D. G., Ju, S. M., You, H.-K., Kim, W. S., An, W. G. and Jeon, B. H. : Screening on monoamine oxidase B inhibitor and antioxidant activity from the water extracts of medicinal plants. *Kor. J. Oriental Physiol. Pathol.* **16**, 458 (2002).
- 31) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
- 32) Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S. and Yagi, K. : Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. *Clin. Chem. Acta.* **79**, 267 (1977).
- 33) Kalaria, R. N., Mitchell, M. J. and Harik, S. I. : Correlation of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity with blood brain barrier monoamine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**, 3521 (1987).

- 34) Muthane, U., Ramsay, K. A., Jiang, H., Jackson-Lewis, V., Donaldson, D., Fernando, S., Ferreira, M. and Przedborski, S. : Difference in nigral neuron number and sensitivity to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine in C57/BL and CD-1 mice. *Exp. Neuro.* **126**, 195 (1994).
- 35) Le, W., Jankovic, J., Xie, W., Kong, R. and Appel, S. H. : (-)-deprenyl of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion (MPP⁺)-induced apoptosis independent of MAO-B inhibition. *Neurosci. Letters* **224**, 197 (1997).
- 36) Rush, G. F., Gorski, J. R., Ripple, M. G., Sowinski, J., Bugelski, P. and Hewitt, W. R. : Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **78**, 473 (1985).
- 37) Götz, M. E., Kunig, G., Riederer, P. and Youdim, M. B. : Oxidative stress: free radical production in neural degeneration. *Pharmacol. Ther.* **63**, 37 (1994).
- 38) Benzi, G. and Moretti, A. : Age- and peroxidative stress-related modifications of the cerebral enzymatic activities linked to mitochondria and glutathione system. *Free Rad. Biol. Med.* **19**, 77 (1995).
- 39) Birkmayer, W., Riederer, P. and Rausch, W. D. : *In advances in neurology* Raven Press, New York, p. 499 (1979).
- 40) Paykel, E. S., Rowan, P. R., Rao, B. M. and Bhat, A. : *In Treatment of Depression, Old Controversies and New Approaches* Raven Press, New York, p. 237 (1983).
- 41) Thomas, T. Monoamine oxidase-B inhibitors in treatment Alzheimers disease. *Neuro. Aging*, **21**, 343 (2000).